

## ПОВЫШЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА С ГЕНОМ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЦЕКРОПИНА P1

Н.С. Захарченко<sup>1</sup>, С.В. Пиголева<sup>1</sup>, О.В. Фурс<sup>1</sup>, В.Д. Креславский<sup>2</sup>, А.А. Кособрюхов<sup>2</sup>, О.В. Дьяченко<sup>1</sup>, Я.И. Бурьянов<sup>1</sup>, Т.В. Шевчук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, Пущино, [zachar@bibch.ru](mailto:zachar@bibch.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пущино, Россия, [kosobr@rambler.ru](mailto:kosobr@rambler.ru)

**Аннотация.** Исследование растений рапса (*Brassica napus* L.) с искусственным геном антимикробного пептида цекропина P1 показало их повышенную устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и окислительному стрессу по сравнению с нетрансформированными растениями.

**Ключевые слова:** *Brassica napus*, цекропин P1, устойчивость к болезням, фотосинтетическая активность

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-346-349

Повышение устойчивости растений к фитопатогенам является одним из важных факторов, определяющих высокий урожай сельскохозяйственных культур и его стабильность. Перспективным методом повышения устойчивости растений к фитопатогенным бактериям и грибам является использование генов антимикробных пептидов (AMP) [Montesinos, 2007]. Так, например, цекропин А, экспрессируемый в рисе, придавал ему устойчивость к грибам *Magnaporthe grisea*, *Fusarium verticillioides* и *Dickeya dadantii* [Coca et al., 2006; Bundo et al., 2014]. Отмечено, что экспрессия AMP в трансгенных растениях способствует не только устойчивости к фитопатогенам, но и смягчает реакцию окислительного стресса [Goyal et al., 2013].

Целью нашей работы было исследование эффекта экспрессии искусственного гена цекропина P1 (*cecP1*) [Martemyanov et al., 1997], кодирующего 31-членную аминокислотную последовательность, в трансгенных растениях рапса на их устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу, вызванному фитопатогенами и ультрафиолетом.

В работе использовали полученные ранее трансгенные растения рапса с геном антибактериального пептида цекропина P1 [Захарченко и др., 2013]. Исследуемые растения поколения F<sub>1</sub> проявляли повышенную устойчивость к бактериальным (*Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*) и грибным (*Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*) фитопатогенам. Уже через сутки на контрольных листьях, зараженных бактериальными штаммами отмечаются признаки пожелтения и некроза. На контрольных листьях, зараженных грибами *F. oxysporum* и *S. sclerotiorum*, признаки повреждения в виде пожелтения листьев проявлялись через 7-10 сут. В то же время, листья трансгенных растений оставались зелеными и неповрежденными. Аналогичные результаты наблюдались при заражении целых растений. Контрольные растения погибали в течение месяца, в то время как у трансгенных растений признаки повреждения оставались незначительными.

Проводился анализ фотосинтетической активности растений после заражения *E. carotovora* и УФ облучения. Растения облучали УФ-В с помощью лампы ЛЭ-30-1, излучающей в диапазоне длин волн 280-380 нм (максимум 315 нм). Интенсивность УФ-

излучения на уровне листьев –  $12 \text{ Вт м}^{-2}$ , время облучения 30 мин.

Анализ фотосинтетической активности растений по параметрам  $\text{CO}_2$  газообмена и скорости транспирации показал, что интенсивность фотосинтеза при бактериальном заражении патогеном *E. carotovora* снижалась уже через 24 часа (табл. 1).

Таблица 1.

**Скорость фотосинтеза, транспирации, эффективности использования воды и устьичной проводимости растений рапса после облучения растений УФ радиацией**

Вариант	$P_n \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$E \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	$P_n/E$	$g_s \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Контроль - УФ	$7,8 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,2$	1,95	$580 \pm 40$
Контроль + патоген - УФ	$5,5 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$	1,64	$490 \pm 25$
Трансгенное растение - УФ	$9,1 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,1$	3,14	$310 \pm 20$
Трансгенное растение+патоген - УФ	$7,2 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,1$	2,66	$270 \pm 10$
Контроль + УФ	$6,2 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	1,48	$450 \pm 15$
Контроль + патоген + УФ	$3,9 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	1,5	$270 \pm 10$
Трансгенное растение + УФ	$7,6 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,2$	2,11	$310 \pm 15$
Трансгенное растение + патоген +УФ	$6,4 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$	1,68	$400 \pm 25$

Эксперимент: через 24 часа после заражения. Интенсивность света при измерении фотосинтеза  $100 \text{ мкмоль м}^{-2}\text{с}^{-1}$ . Представлены средние арифметические ошибки и их стандартные ошибки.

Для трансгенных растений это снижение составило 20,9%, в то время как для контрольных растений (нетрансформированных) снижение составляло 29,5%. Скорость транспирации трансгенных растений и в контроле различалась незначительно, что способствовало большей эффективности использования воды *secPI*-растениями. Облучение ультрафиолетом приводило к снижению фотосинтетической активности растений в контроле и опыте в среднем на 16-20%. Имело место некоторое увеличение скорости транспирации и снижение эффективности использования воды растениями, особенно в контроле. В условиях совместного действия заражения и ультрафиолета у контрольных растений наблюдалось снижение скорости фотосинтеза почти на 50%, в то время как у трансгенных растений – на 29,7%. (табл. 2).

Таблица 2.

**Влияние совместного действия заражения и УФ облучения на скорость фотосинтеза растений рапса (снижение в %)**

Вариант/обработка	Контрольное растение	Трансгенное растение
Действие УФ облучения по сравнению с необлученным растением	20,5	16,5
Действие патогена по сравнению с незараженным растением	29,5	20,9
УФ + патоген по сравнению с необлученным и незараженным растением	50	29,7
УФ на фоне зараженного растения	39,1	11,1

Следует отметить, что полученные данные отражают общую картину влияния заражения и действия УФ облучения на работу фотосинтетического аппарата в условиях данного эксперимента, т.е. действие патогена в течение суток и 30 минутного облучения под УФ лампой.

Для оценки активности первичных световых процессов фотосинтеза использовали метод замедленной флуоресценции (ЗФл) хлорофиллала *a*, который является быстрым и чувствительным тест-методом оценки состояния активности первичных фотосинтетических процессов в стрессорных и неблагоприятных условиях [Bigler, Schreiber, 1990; Veselovskii, Veselova, 1990; Goltsev et al., 2005; Biel et al., 2009]. На основе индукционных кривых рассчитывали относительную амплитуду медленной компоненты ЗФл  $(I_m - D)/D$ , где  $I_m$  максимум медленной компоненты кривой, а  $D$  – минимум на индукционной кривой. Отношение  $(I_m - D)/D$  характеризует фотоиндуцированное изменение  $\Delta pH$  на мембранах тилакоидов и, как следствие, изменение скорости электронного транспорта. Анализ активности фотосистемы II, оцениваемой по параметрам замедленной флуоресценции (табл. 3), показывает, что в условиях заражения активность фотосистемы II снижается в контроле, но мало отличается в трансгенных растениях.

**Таблица 3.**

**Отношения относительных максимумов быстрой  $(I_1-D)/D$  и медленной компонент  $(I_m-D)/D$  ЗФл у дикого типа и трансгенных незараженных и зараженных растений после обработки ультрафиолетом. Даны средние арифметические величины  $(I_1-D)/D \pm SE$  на основе измерений ЗФл у 6, 7 листьев из 2-3 растений**

Вариант	$(I_1-D)/D$	$(I_m-D)/D$
1. Контроль	0.53±0.14	2.5±0.1
2. Трансген	0.50±0.08	2.9±0.12
Контроль (зараженный)	0.54±0.06	1.8±0.24
Трансген (зараженный)	0.50±0.05	2.7±0.1
1. Контроль+УФ	0.0±0.04	0.8±0.2
2. Трансген+УФ	0.06±0.02	1.4±0.06
Контроль (зараженный)+УФ	0.04±0.03	0.55±0.06
Трансген (зараженный)+УФ	0.03±0.01	1.13±0.13

Эти данные характеризуют фотосинтетический аппарат трансгенных растений, как более устойчивый к окислительному стрессу, развиваемому при биотическом и абиотическом стрессе в условиях заражения фитопатогенами и облучения ультрафиолетом, по сравнению с нетрансформированными растениями. Полученные результаты указывают на возможность включения гена цекропина P1 в интегральную антистрессовую защитную систему растений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 18-08-00752, № 16-04-00623 и ГЗ № 0101-2014-0046, № РК 01201352439.*

#### Литература

Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И., Лебедева А.А., Пиголева С.В., Ветошкина Д.В., Локтюшов Е.В., Чепурнова М.А., Креславский В.Д., Кособрюхов А.А. Физиологические особенности трансгенных растений рапса, экспрессирующих ген антимикробного пептида цекропина P1 // Физиология растений. – 2013. – Т. 60, № 3. – С. 424-433. doi: 10.7868/S0015330313030160

Biel K.Ya., Fomina I.R., Kreslavski V.D., Allakhverdiev S.I. Methods for assessment of activity and stress acclimation of photosynthetic machinery in cyanobacteria and symbiotic microalgae // Protocols on Algal and Cyanobacterial Research (W. Kliner, Nath Bogchi S., Mohanty P. Eds.). Narosa Publishing House, New Delhi, Chapter. – 2009. – V. 13. – 20 p.

Bigler W., Schreiber U. Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts //

Photosynth Res. – 1990. – V. 25. – P. 161–171. doi: 10.1007/BF00033158. PubMed: 24420347

Bundo M., Montesinos L., Izquierdo E., Campo S., Mieulet D., Guiderdoni E., Rossignol M., Badosa E., Montesinos E., San Segundo B., Coca M. Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm // BMC Plant Biology. – 2014. – V. 14. – P. 102. doi: 10.1186/1471-2229-14-102.

Coca M., Penas G., Gomez J., Campo S., Bortolotti C., Messeguer J. Segundo B.S. Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice // Planta. – 2006. – V. 223. – P. 392–406. PubMed: 16240149

Goltsev V., Chernev P., Zaharieva I., Lambrev P., Strasser R.J. Kinetics of delayed chlorophyll a fluorescence registered in milliseconds time range // Photosynth. Res. – 2005. – V. 84. – P. 209–215. PubMed: 16049776

Goyal R.K., Hancock R.E.W., Mattoo A.K., Misra S. Expression of an engineered heterologous antimicrobial peptide in potato alters plant development and mitigates normal abiotic and biotic responses // PLoS ONE. – 2013. – V. 8, № 10. e77505. PubMed: PMC3797780

Martemyanov K.A., Spirin A.S., Gudkov A.T. Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin // FEBS letters. – 1997. – V. 414, № 2. – P. 268–70. PubMed: 9315699

Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control // FEMS Microbiol Lett. – 2007. – V. 270. – P. 1–11. PubMed: 17371298

Veselovskii V.A., Veselova T.V. Plant Luminescence. – Moscow: Nauka, 1990. – 200 p.

## ENHANCED RESISTANCE TO BIOTIC AND ABIOTIC STRESS OF TRANSGENIC RAPESEED WITH GENE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE CECROPIN P1

N.S. Zakharchenko<sup>1</sup>, S.V. Pigoleva<sup>1</sup>, O.V. Furs<sup>1</sup>, A.A. Kosobryukhov<sup>2</sup>, V.D. Kreslavski<sup>2</sup>, O.V. Dyachenko<sup>1</sup>, Ya.I. Buryanov<sup>1</sup>, T.V. Shevchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia, [znata\\_2004@rambler.ru](mailto:znata_2004@rambler.ru)

<sup>2</sup>Institute of Fundamental Problems of Biology of the RAS, Pushchino, Russia, [kosobr@rambler.ru](mailto:kosobr@rambler.ru)

**Abstract.** A study of the plants rapeseed (*Brassica napus* L.) with artificial gene antimicrobial peptide cecropin P1 has shown enhanced resistance of transgenic plants to phytopathogenic microorganisms *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* and oxidative stress, as compared to the nontransformed plants.

**Keywords:** *Brassica napus*, cecropin P1, disease resistance, photosynthetic activity